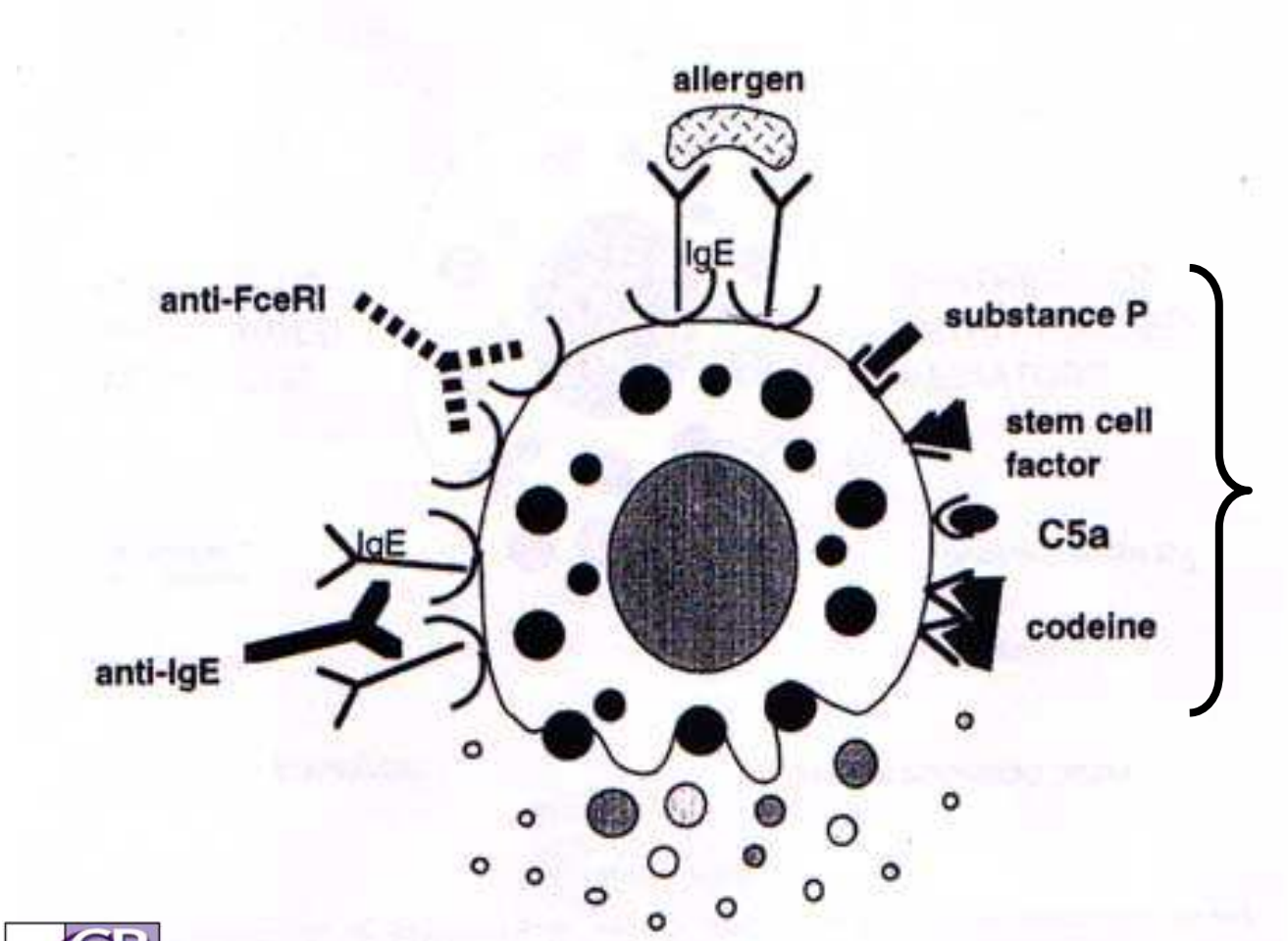
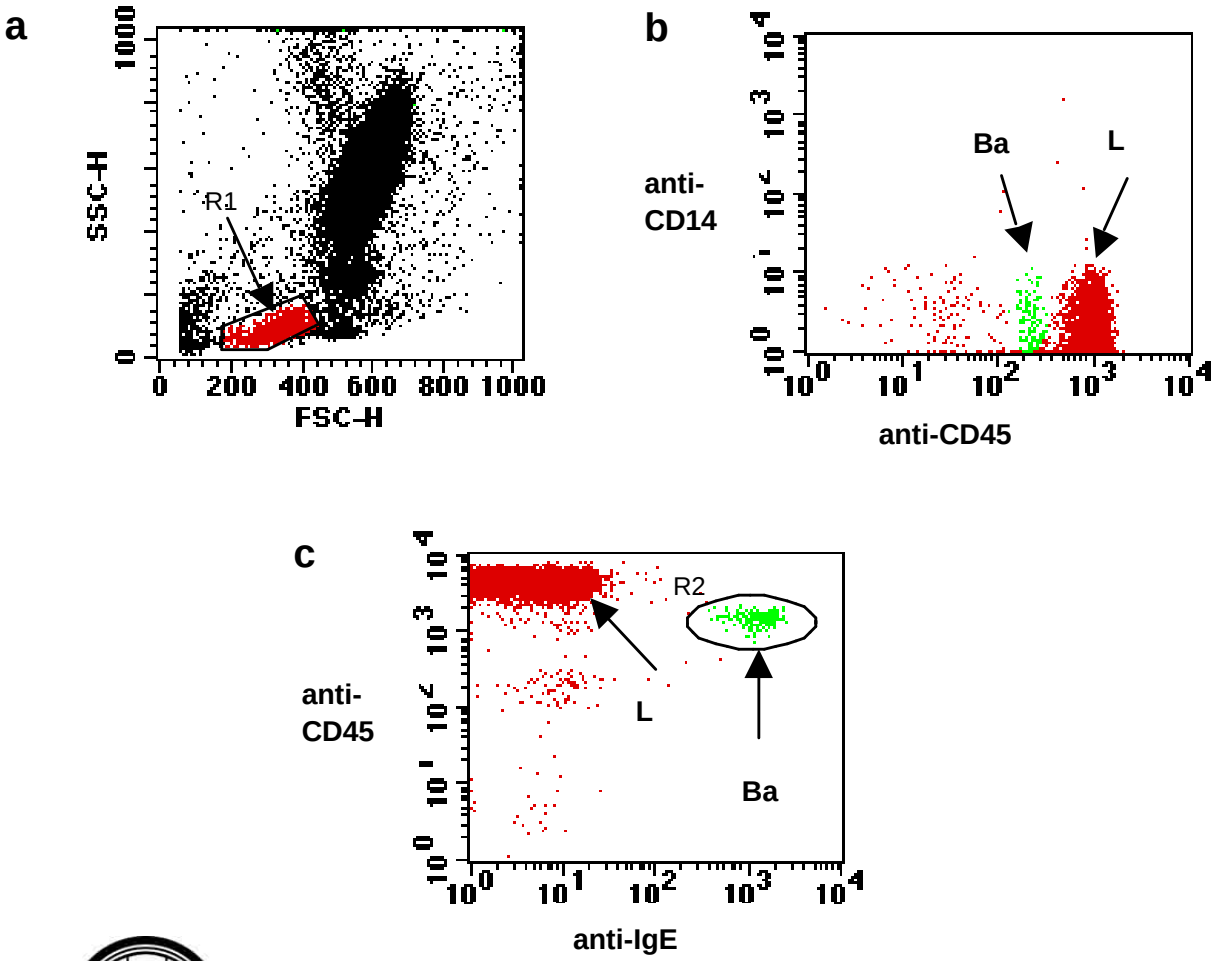
Estudios de hipersensibilidad inmediata

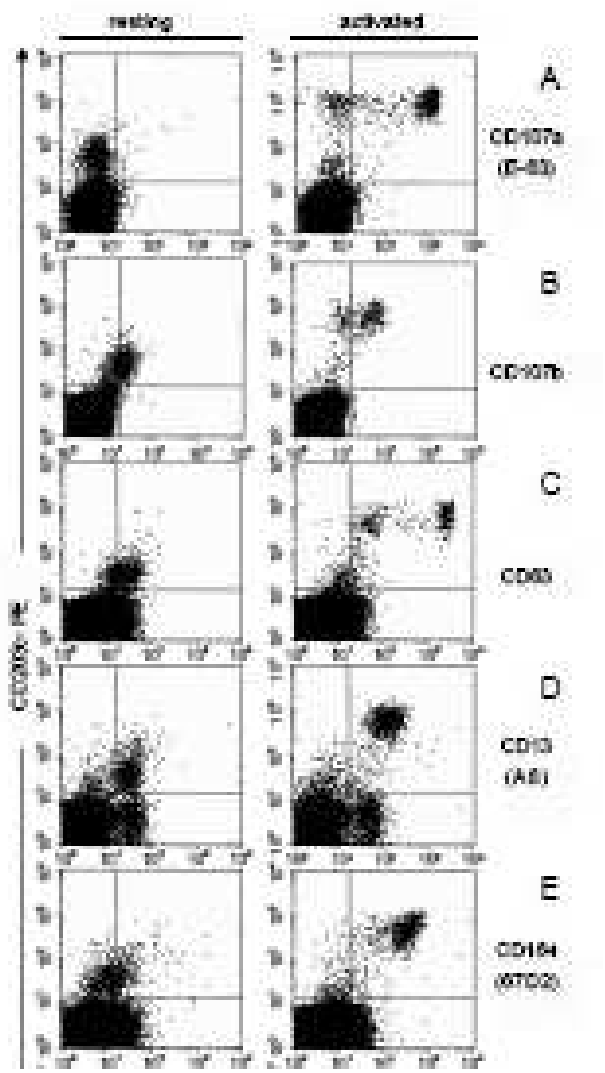
-Alergia a drogas, medicamentos o distintos alergenos.
-Recuento de basófilos.
-Diagnóstico autoinmune de urticaria crónica.

Degranulación de mastocitos y basófilos



Pseudoalergenos


a
SSC-H
FSC-H
R1
0
200
400
600
800
1000
b
anti-
CD14
anti-CD45
Ba
L
c
anti-
CD45
anti-IgE
R2
L
Ba



CD107a

CD107b

CD63

CD13

CD164

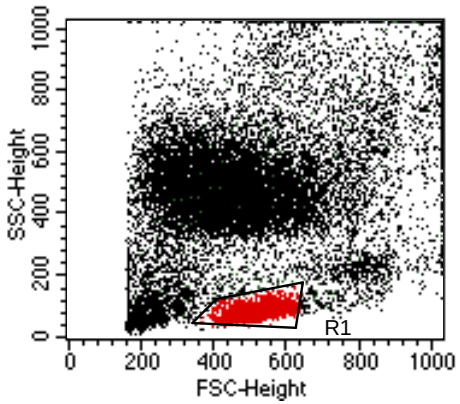
Marcadores de activación en basófilos después del entrecruzamiento del FcεRI

Expresión rápida: CD203c, CD13, CD164
Expresión tardía: CD63 y CD107a

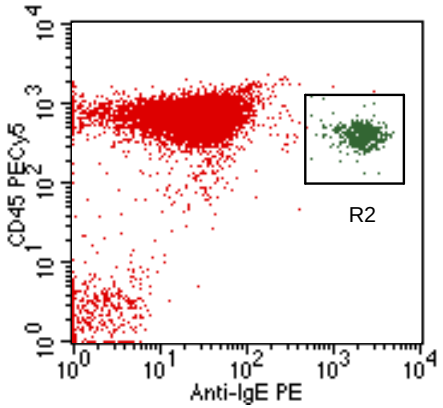
Hennersdorf F. y col

Cell Research, 15(5):325-335, May 2005

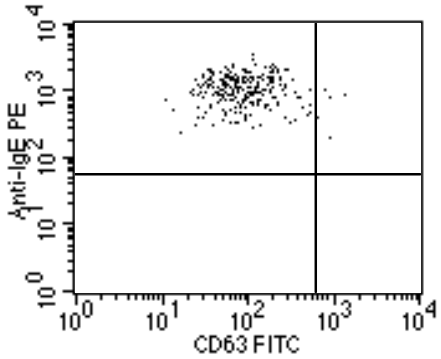
A

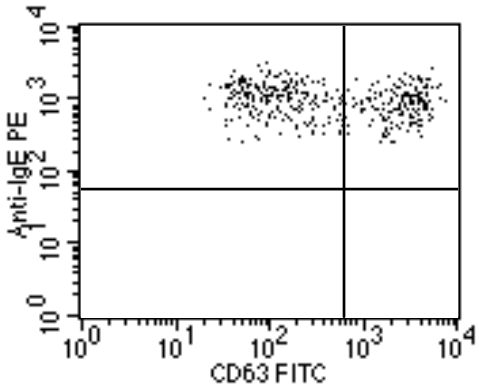


B



R1 AND R2



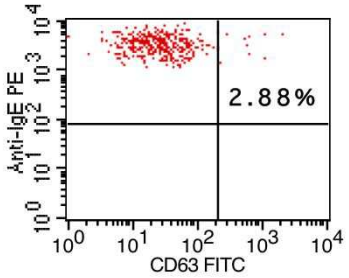


Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	272	98.55	1.18	111.73	1154.12
UR	4	1.45	0.02	993.58	723.34
LL	0	0.00	0.00	***	***
LR	0	0.00	0.00	***	***

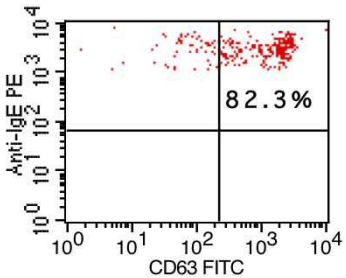
Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	235	57.04	1.06	164.51	1151.60
UR	177	42.96	0.80	2914.37	954.18
LL	0	0.00	0.00	***	***
LR	0	0.00	0.00	***	***

Reacción de Hipersensibilidad Inmediata

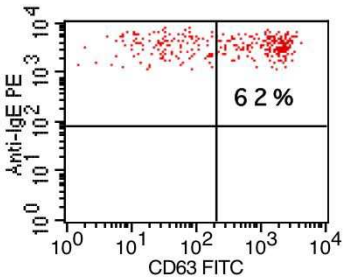
Sin Activar



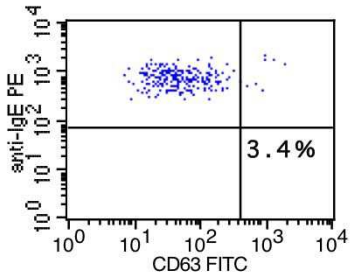
Dp



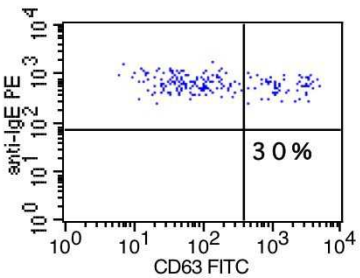
fMLP



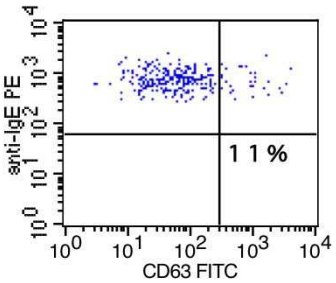
Sin Activar



OFF

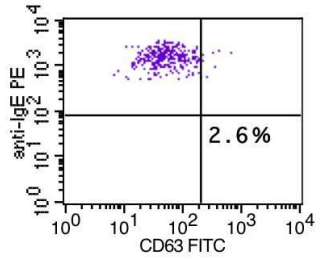


fMLP

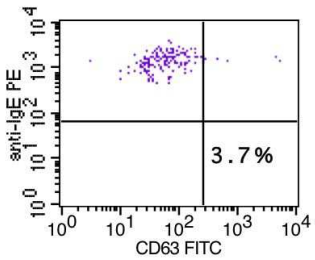


Reacción de Hipersensibilidad Inmediata a medicamentos

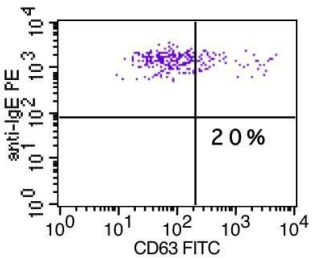
Sin Activar



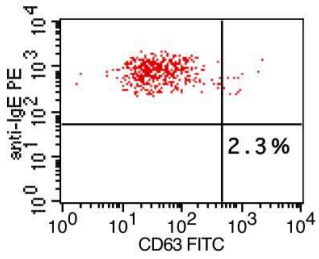
Diclofenac



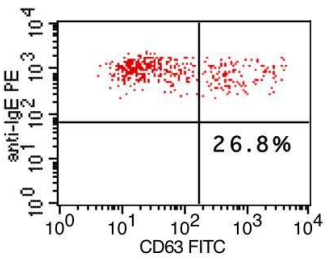
fMLP



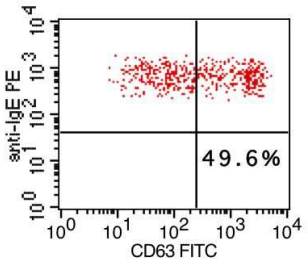
Sin Activar



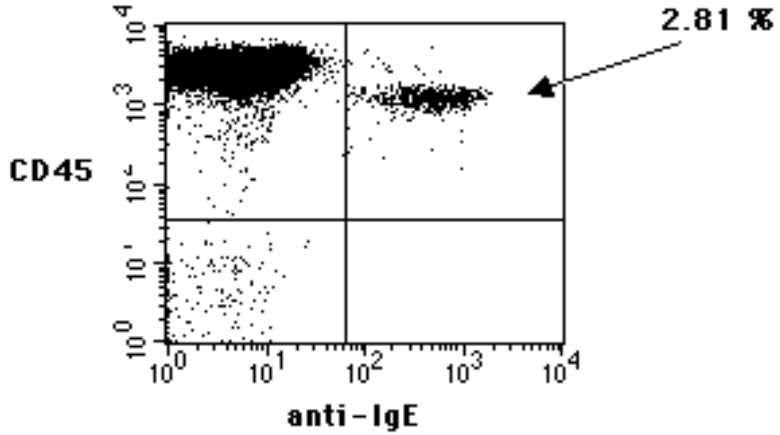
Penicilina

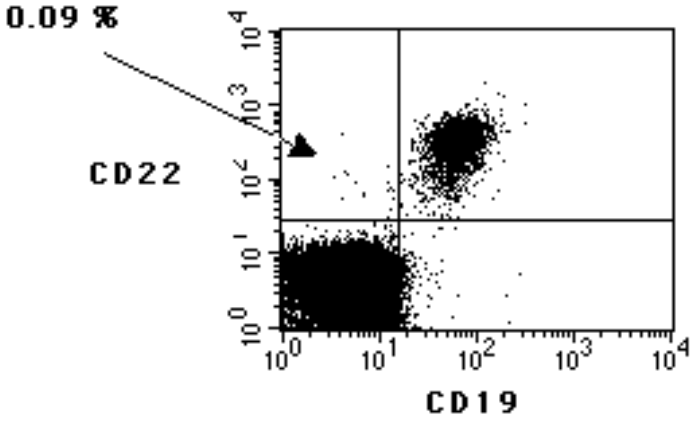


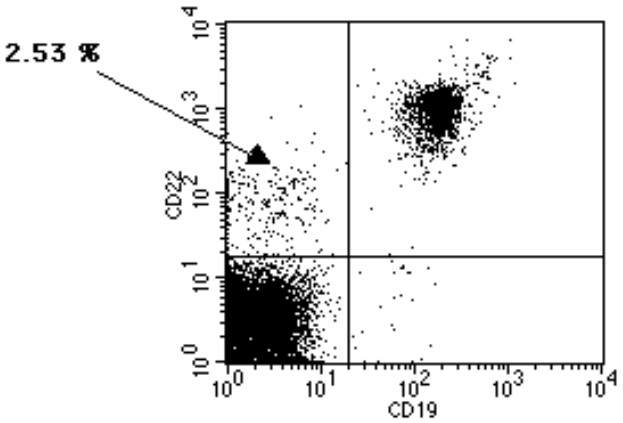
fMLP



Elección del clon del anticuerpo monoclonal: un ejemplo.







Utilización de las microesferas en Citometría de Flujo

¿Qué son las microesferas?

- Son microesferas de poliestireno, poliacrilamida, latex, polimetilmetacrilato o dextrano.
- 0.05µm- 90µm diámetro (semejante al tamaño celular).
- Pueden ser fluorescentes o no.
- Capacidad de pegar proteínas en su superficie en forma covalente o por simple adsorción.
- Estabilidad del pegado: 4-6 meses (adsorción).
- Pegado de DNA, lectinas, enzimas, péptidos, etc.

Aplicaciones

- Control de calidad del equipo.
- Indicadores de tamaño.
- Cuantificación celular- recuentos absolutos.
- Inmunoensayos para detección de sustancias solubles
- Cuantificación de fluorescencia

Calibración del equipo

Antes de comenzar a trabajar hay que calibrar el equipo. Para ello se emplean beads y se realiza la calibración en forma automática y no se emplea la muestra para ello porque

1- Para ensayos multicolor (6-8 colores o más) es muy engorroso hacerlo manualmente

2. Si empleamos la muestra perdemos mucho volumen útil para la marcación final

3. Las células de interés que expresan el antígeno pueden estar en bajo %

4- O el antígeno de interés puede expresarse en baja Intensidad

5- Dependemos de la integridad de la muestra

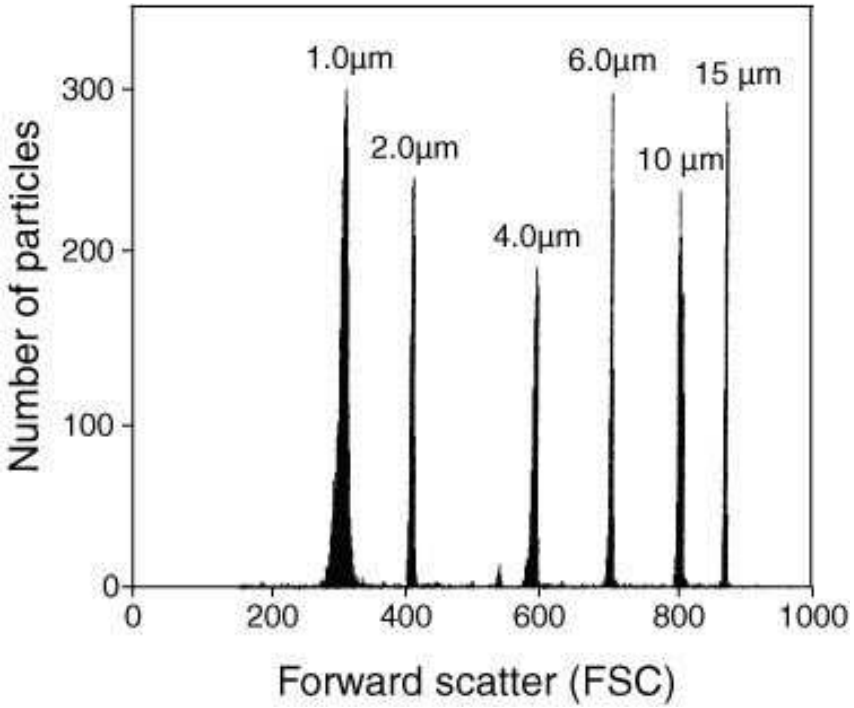
Son kits comerciales compuestos de beads negativas es decir no fluorescentes para el ajuste de los voltajes y un lote de beads para cada fluorocromo que vamos a emplear en la marcación para el ajuste de la compensación

GRUPO RIOPLATENSE DE CITOMETRIA DE FLUJO

IMEX CONICET ANM

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA BUENOS AIRES

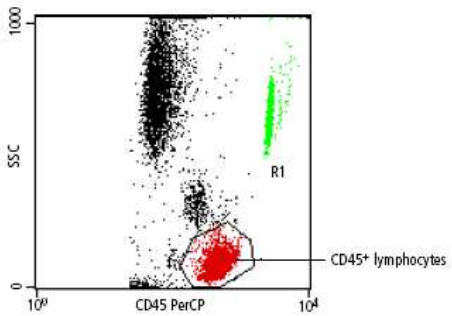
Partículas indicadoras de tamaño

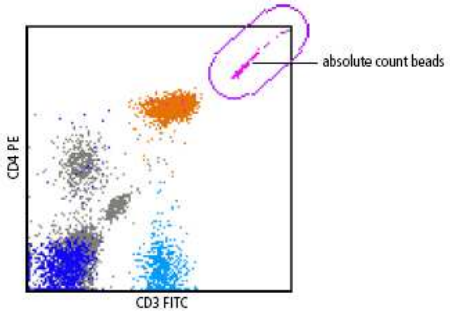


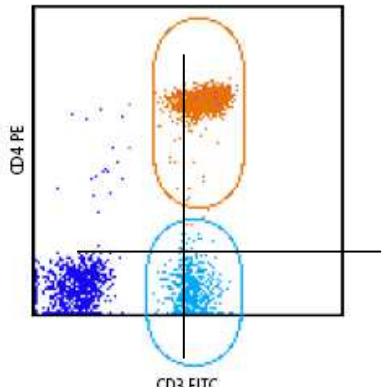
- Mezcla de partículas no fluorescentes de 6 tamaños distintos
- Se marcan regiones en las posiciones de las beads con diferentes tamaños
- Se corre la muestra y se identifica el tamaño de la población de interés o gracias al tamaño se identifica la población

Kit para recuentos absolutos

- Tubos precargados con una cantidad conocida de beads que presentan alta fluorescencia.
- Se agregan los anticuerpos monoclonales conjugados con los fluorocromos
- Se adicionan 50 ul de muestra empleando el pipeteo reverso.
- Lisis sin lavar.
- Se adquiere
- Ajustar el umbral de forma que se minimicen los restos celulares.







Region Statistics

Tube: Untitled
Gate: No Gate
Total Events: 51944

Panel: Untitled Acquisition Tube List
Gated Events: 51944

Region	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean	Px,P
R1	9773	18.81	18.81	289.71	90.51	1,
R2	1364	2.63	2.63	498.04	258.31	1,

Quadrant Statistics

Tube: Untitled
Gate: G1
Total Events: 51944

Panel: Untitled Acquisition Tube I
Gated Events: 9773
Quad Location: 66, 17

Quad	Events	% Gated	% Total	X Mean	Y Mean
UL	97	0.99	0.19	7.57	143.09
UR	2437	24.94	4.69	532.85	1634.99
LL	1284	13.14	2.47	4.79	3.04
LR	5955	60.93	11.46	385.21	2.78

$$\frac{\text{N° de eventos CD3+CD4+ (2437)}}{\text{N° de microesferas en R2 (1364)}} \times \frac{\text{N° Total de Microesferas (Dato del fabricante)}}{\text{Volumen de la muestra (ul)}}$$

Dos tipos de citómetros

-**Plataforma única**

Tienen dispositivos especiales para realizar los recuentos absolutos directamente a partir de la muestra.

-Plataforma doble

Necesitan incorporar el dato del hemograma para poder calcular los valores absolutos. O se debe recurrir a los kits con microesferas para poder obtener esos valores

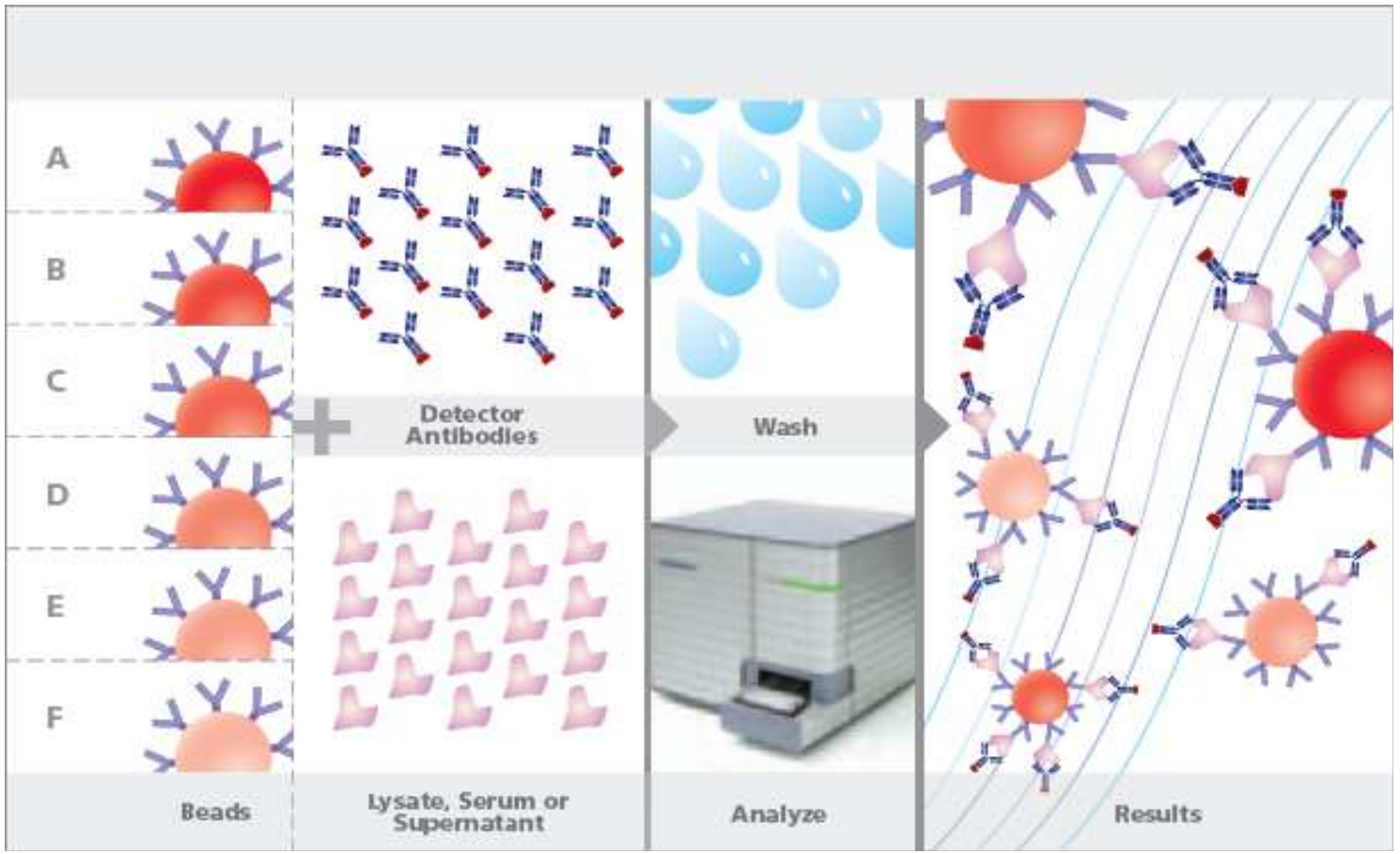
Inmunoensayos

- Para la medición de analitos solubles se suelen usar ensayos basados en reacciones inmunológicas.
- Inmunoensayo “sandwich” que utiliza partículas plásticas fluorescentes que pueden unir antígenos solubles (1-15µm).
- El reactivo de captura puede ser un Ag o un Ac, pero puede ser cualquier sustancia que sea de un material con suficiente afinidad de pegado al analito
- Permite el análisis de múltiples analitos solubles en forma simultánea.
- Volumen mínimo de muestra.
- Menor tiempo de procesado.
- El analito capturado se detecta por anticuerpos fluorescentes.

Kits para detectar en simultáneo varios metabolitos (Multiplex Assay)

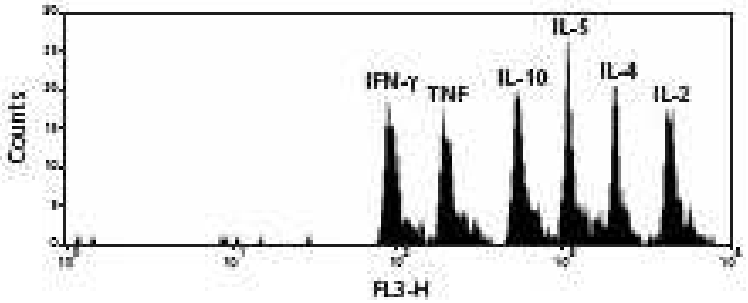
-microesferas que emiten fluorescencia de distinta intensidad

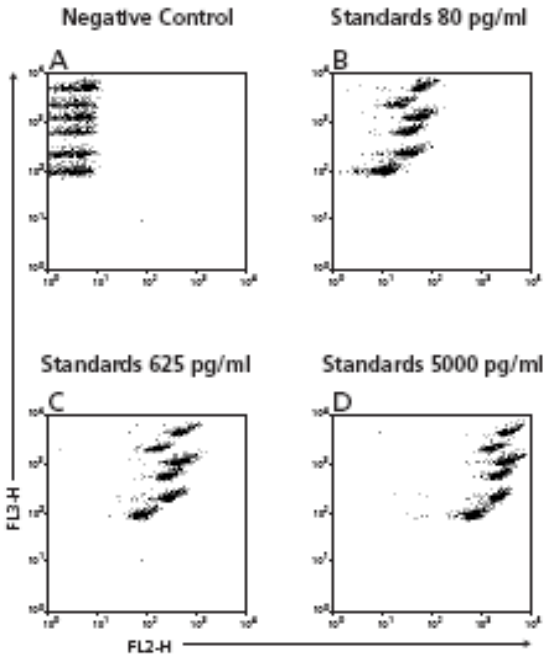
-contienen grupos Carboxil en su superficie para unir covalentemente biomoléculas



- Software para análisis de resultados en pg/ml.

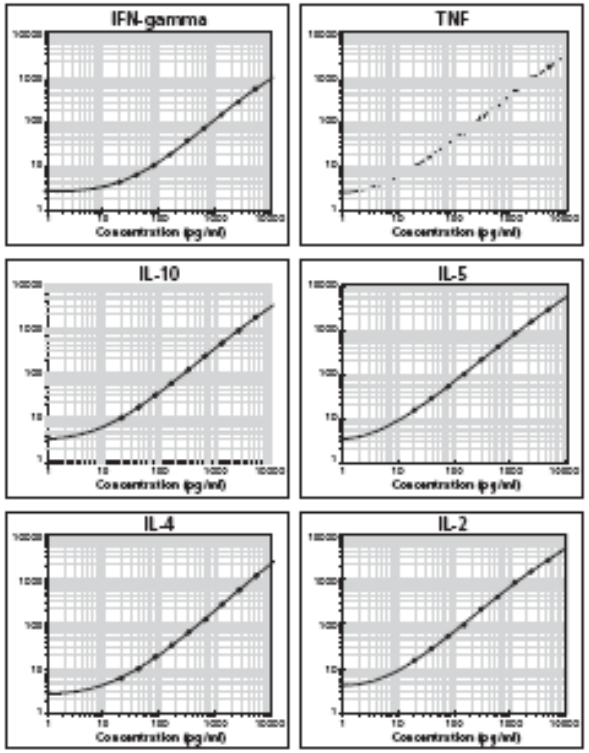
Ejemplo 1: Valoración de citoquinas en fluídos





Datos de la curva de calibración

Cada lote con el anticuerpo de captura para una determinada citoquina tiene una intensidad para FL-3 bien definida



Curva generada con el software

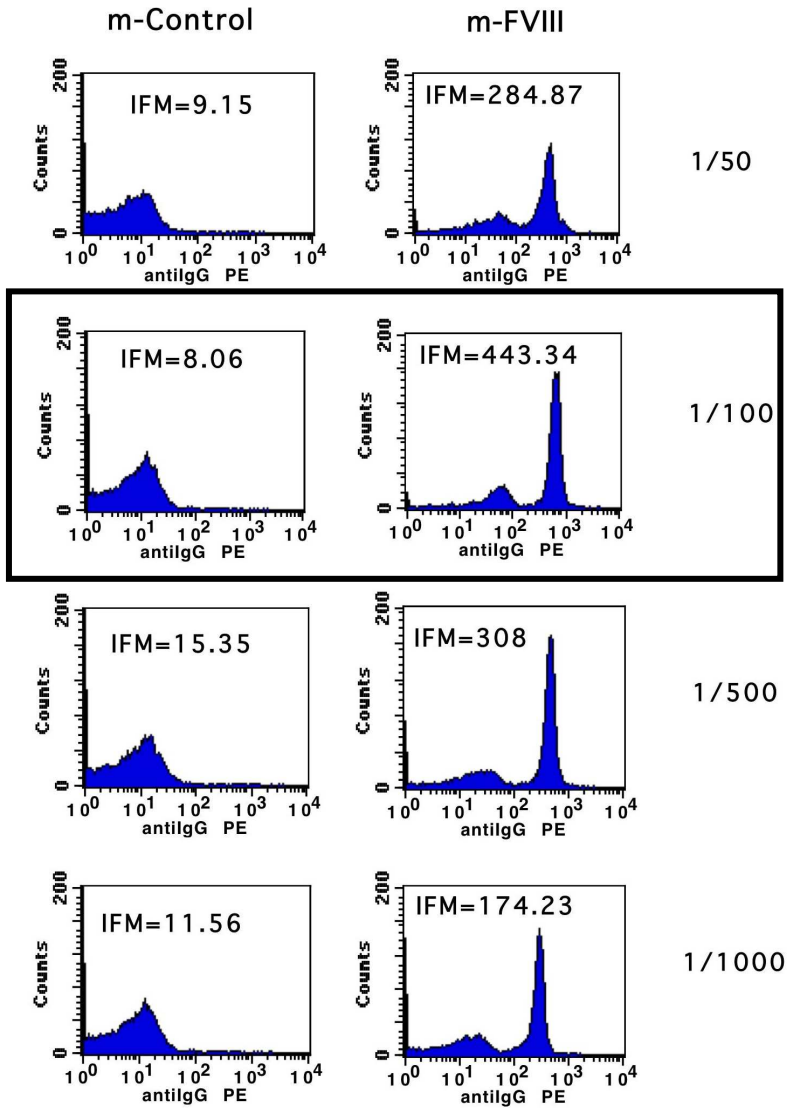
Software

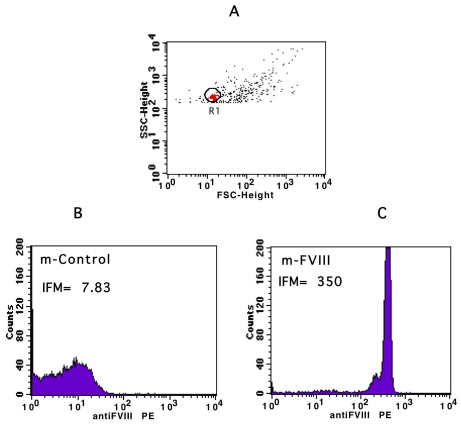
GRUPO RIOPLATENSE DE CITOMETRIA DE FLUJO

I M E X
CONICET
A N M

ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA BUENOS AIRES

Cálculo del título de anticuerpos anti-FVIII por Citometría de Flujo: Empleando Microesferas con el FVIII adsorbido a su superficie





Título como Indice

IFM de m-FVIII / IFM de m-control x Inversa de la Dilución correspondiente

$$\frac{443{,}34}{8{,}06} \times 100 = 5500$$

Cuantificación de receptores

- Microesferas(10µm) cubiertas con

  -distintas cantidades, definidas por el fabricante, de moléculas del fluorocromo al que está conjugado el Ac monoclonal del ensayo (por ejemplo PE)

  -distintas cantidades definidas por el fabricante de moléculas del Ac del ensayo.

  CURVA DE CALIBRACION

- Las células a evaluar el receptor son marcadas con el Ac del ensayo conjugado con el mismo fluorocromo
- Se calcula el ABC (Anticuerpos unidos por célula) extrapolando en la curva de calibración. Se necesita el valor de la relación

  molécula de Ac:molécula del fluorocromo
- Es una medición semicuantitativa

GRUPO RIOPLATENSE DE CITOMETRIA DE FLUJO
I M E X
CONICET
A N M
ACADEMIA NACIONAL DE MEDICINA BUENOS AIRES

Cuantificación Antigénica

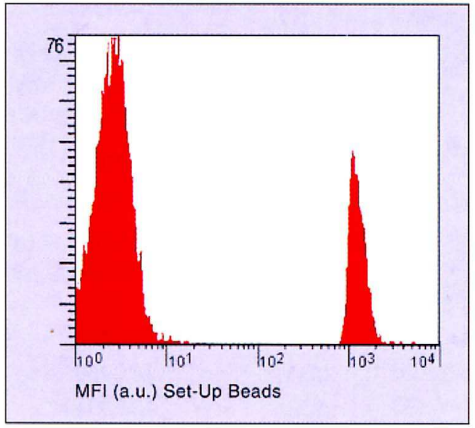


Figure 1. Set-Up Beads are used to establish the Window of Analysis. Instrument settings are adjusted until both populations are displayed.

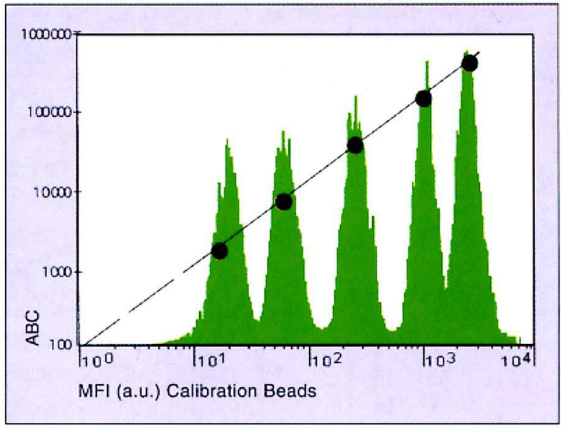


Figure 2. Calibration Beads are used for construction of the calibration curve.

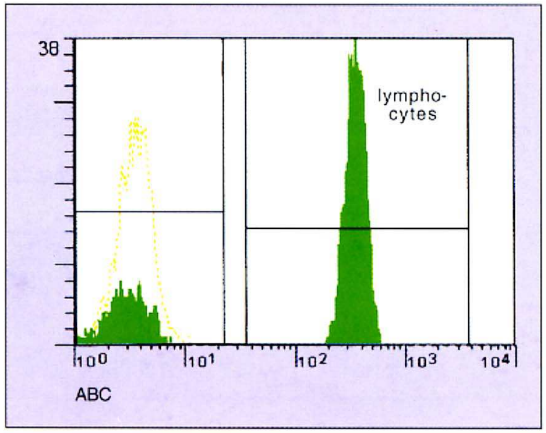


Figure 3. Quantitation of the CD4 antigen density on lymphocytes from whole blood samples

La cuantificación antigénica se utiliza para aquellos marcadores que presentan variaciones cuantitativas en procesos madurativos, de activación, regulación, infecciosos, apoptosis y situaciones patológicas.
Por ejemplo:
HIV CD38
CD4 CD10 CD55 CD59 CD41/CD61 (GpIIb/IIIa), CD64 en sepsis, CD20 o CD52 en pacientes con terapia monoclonal

Fin de la cuarta parte

Muchas gracias